DOI:10.11931/guihaia.gxzw202305039

芥菜 *BjGSTF12* 基因克隆及表达分析

朱云娜，陈凤梅，李芷娴，王斌，冯慧敏，胡芳，李海渤*
（广东省粤北食药资源利用与保护重点实验室/韶关学院 生物与农业学院，
广东 韶关 512005）

摘要：为了探究谷胱甘肽转移酶编码基因（*GST*）在芥菜花青素积累中的作用，该文以紫薹-绿薹芥菜近等基因系为材料，克隆到 1 个花青素积累相关的 *GST* 基因，命名为 *BjGSTF12*。该文对 *BjGSTF12* 编码蛋白及其启动子进行生物信息学分析，并分析其在绿薹、紫薹芥菜中的表达水平及其与花青素含量的关系。结果表明：（1）*BjGSTF12* 的基因组和 cDNA 全长分别为 808、651 bp，编码 216 个氨基酸，具有 GST_N 端和 GST_C 端保守结构域。然而，绿薹、紫薹芥菜 *BjGSTF12* 序列无区别。（2）BjGSTF12 与拟南芥 AtGSTF12 亲缘关系最近，同属于φ亚类。（3）2 个芥菜品系 *BjGSTF12* 启动子序列存在 4 处碱基突变/插入，但二者顺式作用元件种类与数目相同，均含 9 个 MYB 结合位点、1 个赤霉素响应元件、3 个非生物胁迫响应元件。（4）紫薹芥菜花青素含量显著高于绿薹芥菜的，*BjGSTF12* 表达水平与花青素含量表现出类似变化规律。（5）互作蛋白网络分析表明，BjGSTF12 与花青素合成关键酶、糖基化修饰、转运蛋白等蛋白存在互作。因此，BjGSTF12 在芥菜薹茎花青素积累中可能发挥重要作用，推测 BjGSTF12 可能通过互作蛋白调控芥菜花青素合成、修饰、转运从而影响花青素积累。综上所述，该文对进一步深入研究 GST 在芥菜薹茎花青素积累的功能及作用机制奠定一定理论基础。

关键词：芥菜，GST，生物信息学分析，表达分析，花青素积累
中图分类号：Q943　　　　　　　**文献标识码：**

Cloning and expression analysis of *BjGSTF12* in *Brassica juncea*

ZHU Yunna, CHEN Fengmei, LI Zhixian, WANG Bin, FENG Huimin,
HU Fang, LI Haibo*
(*Guangdong Provincial Key Laboratory of Utilization and Conservation of Food and Medicinal Resources in Northern Region / College of Biology and Agriculture, Shaoguan University*,
Shaoguan 512005, Guangdong, China)

Abstract: To explore the role of glutathione S-transferase gene (*GST*) in the accumulation of anthocyanin in *Brassica juncea*, one *GST* gene related to the anthocyanin accumulation was cloned from near-isogenic lines of *Brassica juncea* with purple stalk and green stalk, and named as *BjGSTF12*. In this study, the bioinformatics characteristics of *BjGSTF12* encoding protein and promoter were analyzed, the expression level of *BjGSTF12* and the relationship with total

---

基金项目：广东省科技专项资金项目（210903164532210）；韶关学院大学生创新创业计划项目（Sycxcy2022155）。

第一作者：朱云娜（1982-），博士，讲师，主要从事蔬菜生理与分子生物学研究工作，（E-mail）zhuyn326@126.com。

***通信作者：**李海渤，博士，副教授，主要从事油菜和芥菜遗传育种研究，（E-mail）lihai-bo@163.com。

anthocyanin content were analyzed in *Brassica juncea* lines with purple stalk and green stalk. The results were as follow: (1) *BjGSTF12* genes from *Brassica juncea* were successfully cloned, whose the full length of *BjGSTF12* in genome and cDNA was 808 bp and 651 bp, encoding a protein of 216 amino acids. The BjGSTF12 contained the typical domains of GST proteins, namely GST_N and GST_C. However, their sequences of *BjGSTF12* did not exhibit any differences between the two lines of *Brassica juncea*. (2) BjGSTF12 was closely related to AtGSTF12 in *Arabidopsis*, and both belonged to the φ subfamily of GST family. (3) The *BjGSTF12* promoter sequences were cloned from two *Brassica juncea* strains of green stalk and purple stalk, and they exhibited 4 base mutations/insertions. However, the types and numbers of cis-acting elements did not show obvious differences between the two strains, including 9 MYB transcription factor binding sites, 1 hormone response element, and 3 abiotic corresponding elements. (4) The total anthocyanin content in *Brassica juncea* of purple stalk was significantly higher than that in green stalk ones, and the expression level of *BjGSTF12* in two lines was found to be similar to the total anthocyanin content in both lines. (5) Protein interaction network analysis revealed that BjGSTF12 may interact with the key enzymes of anthocyanin biosynthesis, glycosylation modification, and transporter proteins. In summary, BjGSTF12 is likely to play a key role in the accumulation of anthocyanin in *Brassica juncea* by regulating its biosynthesis, modification, and transportation through interactions with other proteins. This study provides a theoretical basis for further study on the function of GST and the mechanism of anthocyanin accumulation in *Brassica juncea*.

Keywords: *Brassica juncea*, GST, bioinformatics analysis, expression analysis, anthocyanin accumulation

谷胱甘肽转移酶（glutathione S-transferase，GST，EC 2.5.1.1.8）是一种具有多功能的超家族酶，广泛存在于生物界，主要催化还原型谷胱甘肽（glutathione，GSH）和疏水、亲电底物共价结合形成共轭物，将生物体内潜在的有毒物质和外来的有害物质隔离在液泡或转移到质外体，从而达到解毒目的（Cummins et al., 2011；陈秀华等，2013；张雪等，2017）。根据 GST 家族的基因结构、氨基酸序列相似性以及催化底物等性质的不同，GST 基因家族分为 7 个亚类，分别为φ（phi，F 型）、τ（tau，U 型）、ζ（zeta，Z 型）、θ（theta，T 型）、λ（lambda，L 型）、脱氢抗坏血酸还原酶（dehydroascorbate reductase，DHAR）和四氯对苯二酚脱卤酶（tetrachlorohydroquinone dehalogenase，TCHQD），其中，φ和τ是植物所有特有的 GST 类型（Mohsenzadeh et al., 2011）。GST 蛋白均包含 N 端和 C 端 2 个结构域，其中，N 端为 GSH 特异结合位点（G 位点），该位点较保守，C 端包含结合疏水底物的结合位点（H 位点），该位点可变性较大（邢磊等，2020）。

目前已从拟南芥（Mohsenzadeh et al., 2011）、油菜（Wei et al., 2019）、石榴（刘龙博等，2021）等多个物种中分离鉴定了 *GST* 基因，其功能主要体现在以下三个方面：（1）催化 GSH 与有毒异源物质或氧化产物结合，促进其代谢、隔离或清除，从而降低有毒物质对细胞伤害（陈秀华等，2013）；（2）参与调控植物对盐胁迫、重金属胁迫等非生物胁迫条件下的抗逆能力（Lallement et al., 2014；邢磊等，2020；张创娟等，2022）；（3）参与花青素等次生代谢物的跨膜运输定位（Marrs et al., 1995）。玉米 *Bronze-2* 是研究发现的第一个在花青素积累中起重要作用的 *GST* 基因（Marrs et al., 1995）。*Bronze-2* 的同源基因，如拟南芥 *TT19*（*GSTF12*）（Sun et al., 2012）、猕猴桃 *AcGST1*（Liu et al., 2019）、棉花 *GhGSTF12*（Shao et al., 2021）、萝卜 *RsGSTF12*（Niu et al., 2022）等陆续被报道，这表明 *GST* 基因在

花青素积累中的作用是高度保守的。由此可见，GST 基因成员在植物花青素积累中发挥着重要作用。

芥菜（*Brassica juncea* ）是十字花科芸薹属作物，为世界重要的蔬菜、油料、调料作物。在我国，芥菜可分为根、茎、叶、薹等四大类 16 个变种（刘佩瑛，1996），除西藏等高寒山区外，芥菜在全国各地均有栽培（万正杰等，2020）。随着人民生活水平的日益提高与环境条件的变化，对芥菜品质和品种抗性提出了新要求（符梅等, 2022）。培育紫色蔬菜品种对提高蔬菜的经济价值和营养价值具有重要意义。课题组以紫茎埃芥与棒菜经多代回交及自交，选育了紫薹-绿薹芥菜近等位基因系（201-402）。该文以紫薹-绿薹芥菜近等位基因系为材料，采用同源克隆方法对芥菜 *BjGSTF12* 基因及启动子进行克隆，通过生物信息学软件对其编码的蛋白序列进行同源性分析和系统进化分析，启动子序列的顺式作用元件分析，并分析其在紫薹、绿薹近等位基因系芥菜中的表达情况及其花青素含量之间的关系，拟探讨以下问题：（1）*BjGSTF12* 基因及启动子序列在紫薹芥菜和绿薹芥菜中是否存在差异；（2）紫薹、绿薹芥菜薹茎花青素含量分析，*BjGSTF12* 基因在紫茎芥菜和绿茎芥菜中的表达情况；（3）芥菜 BjGSTF12 的互作蛋白分析。本研究结果将为探究紫薹和绿薹芥菜花青素含量差异提供信息，为进一步解析 *BjGSTF12* 在芥菜薹茎花青素积累中的作用奠定基础，为芥菜种质资源的有效利用与合理保护等提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为课题组选育紫薹-绿薹芥菜近等位基因系（201-402）。2022 年 10 月至次年 2 月，将芥菜种植于广东省韶关市韶关学院英东生物与农业学院生态园连栋温室内。

1.2 试验材料的种植和取样

芥菜种子用 7.5%的 NaClO 消毒 10 min，用无菌水清洗 4 ~ 5 次，将种子播种于泥炭：蛭石=3:1 基质中进行育苗，待芥菜幼苗长至三叶一心进行定植，统一水肥管理，在移栽前、整地时一次性施入复合肥（N-P_2O_5-K_2 为 15-5-25）50 kg/667 m^2。移栽 40 d 后，待其抽薹，选取生长状态一致的紫薹芥菜、绿薹芥菜植株，取新鲜茎，撕取表皮后剪碎，液氮速冻后，保存在–80 ℃冰箱中备用，每个样品取 3 个生物重复，每个生物重复取 4 ~ 6 株。

1.3 芥菜薹茎花青素含量的测定

花青素含量测定：取 0.05 g 左右紫薹芥菜、绿薹芥菜表皮，切碎后，放入 5 mL 的 1% HCl 甲醇溶液室温避光过夜浸提，利用 UV-2600 型紫外分光光度计测定波长在 530 nm 下的吸光值（Li et al., 2016）。

1.4 基因组 DNA、总 RNA 的提取及 cDNA 合成

参照天根生物技术公司的新型基因组 DNA 提取试剂盒提取芥菜基因组 DNA，参照普洛麦格生物技术公司的 Eastep® Super 植物总 RNA 提取试剂盒和 GoScript™ Reverse Transcription System 分别提取总 RNA、合成 cDNA。

1.5 基因克隆及阳性克隆鉴定

根据十字花科基因组数据库（*Brassicaceae* Database）中的芥菜基因组数据 Braju_tum_V2.0 中的 *BjGSTF12* 基因序列（*BjuVB05G21730*）设计引物（表 1）。

表 1 该文所用的引物和序列

Table 1 The primers and sequences used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5′ －3′)	用途 Usage
GSTF12	F: ATGGTTGTGAAACTATACGGACAGG	基因克隆
	R: TCAAGCTAATCCAAAACCAGCC	Gene clone
GSTF12pro	F: TTTGAAATCAGTGTGAATCAGCTTC	启动子克隆

	R: TGAGAAGAAGTGAGAGTAGATGTGT	Promoter clone
q-GSTF12	F: CTCAAAGTGAAGCTCGGGGT	荧光定量 PCR
	R: CGTAACCTCTTCCCACCACC	Real-time PCR
Actin2	F: CATCCTCCGTCTCGACCTTG	荧光定量 PCR 内参
	R: AGTCCACAGCGACAAAGGAG	Reference gene of real-time PCR

以表 1 中 GSTF12 为引物，以紫薹芥菜薹茎 DNA、cDNA 样品分别为模板，克隆芥菜 *BjGSTF12* 基因。PCR 产物回收扩增得到的基因产物，连接到 pMD20-T 载体，并转化到大肠杆菌 DH5α感受态细胞，经过 PCR 鉴定后，选取阳性克隆送到广州擎科生物技术有限公司进行测序。

1.6 生物信息学分析

参照表 2 所列的生物信息学软件或网址对芥菜 *GSTF12* 基因及其编码氨基酸进行分析。

表 2 该文所用的软件及网址

Table 2 Software and website used in this study

软件 Software	网址 Website	用途 Usage
ExPASY ProtScale	https://web.expasyorg/	理化特性分析 Analysis of physicochemical properties
Plant-PLoc server	www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/PlantPloc.cgi	亚细胞定位 Sub cellular localization
TMHMM Server 2.0	https://sevices.healthtechdtudk/servi.php?TMHMM-2.0	跨膜结构分析 Analysis of protein transmembrane
NetPhos 3.1	http://www.cbs.dtudk/services/NetPhos/	磷酸化位点分析 Phosphorylation site analysis
SignalP 5.0	https://sevices.healthtech.dtudk/servie.php?SignalP-5.0	蛋白质信号肽预测 Protein signal prediction
SWISS-MODEL	https://www.swissmode.expasy.org/	蛋白质三维结构 Three-dimensional structure of protein
MEME	http://meme-suite.org/meme/	保守基序分析 Conserved motif analysis
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/	保守结构域分析 Conserved domains analysis
STRING	https://string-db.org/	蛋白互作分析 Protein interaction analysis
Plantcare	http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/	启动子作用元件分析 Cis-acting regulatory element analysis
TBtools	Chen et al., 2020	作用元件可视化 Visualization of cis-acting regulatory element

1.7 *BjGSTF12* 在紫薹、绿薹芥菜薹茎中的表达量分析

根据 SYBR Green® Premix Ex *Taq*™ 进行荧光定量 PCR 分析，以 *Actin2* 为内参基因，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量（Livak & Schmittgen, 2002）。

1.8 芥菜 *BjGSTF12* 启动子的克隆与顺式作用元件分析

以紫薹、绿薹芥菜基因组 DNA 为模板，以表 1 中 GSTF12Pro 为引物，克隆芥菜 *BjGSTF12* 启动子序列，连接 pMD20-T 载体，转化大肠杆菌 DH5α感受态细胞后，挑选阳性克隆进行

测序。利用 DNAMAN 软件对 2 个品种的启动子序列进行比对，利用 Plantcare 网站对其启动子序列进行顺式作用元件分析，并利用 TBtools 对作用元件进行可视化（Chen et al., 2020）。

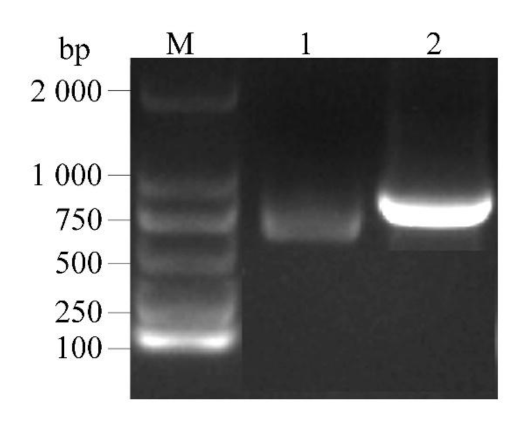
1.9 统计分析与作图

利用 Microsoft Excel 2010 进行数据整理，利用 SPSS 19.0 进行 Duncan's 显著性分析，利用 SigmaPlot 11.0 进行作图。

2 结果与分析

2.1 芥菜 *BjGSTF12* 基因的克隆

提取紫薹芥菜薹茎 DNA 和总 RNA，将总 RNA 反转录为 cDNA，以其为模板，利用表 1 中 GSTF12-F/R 为引物，克隆芥菜 *BjGSTF12* 基因。经过 PCR 扩展，获得目的条带如图 1 所示。测序结果显示，芥菜 *BjGSTF12* 基因的基因组序列和开放阅读框序列分别为 808、651 bp。



M. DL2000 DNA Marker；**1.** 以cDNA为模板的PCR扩增产物；**2.** 以基因组DNA为模板的PCR扩增产物。

M. DL2000 DNA Marker; **1.** PCR amplification product of cDNA; **2.** PCR amplification product of genomic DNA.

图 1 *BjGSTF12* 基因的 PCR 产物琼脂凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of *BjGSTF12* from *Brassica juncea*

利用Gene Structure Display Server 2.0软件绘制芥菜*BjGSTF12*基因结构图，结果如图2所示。芥菜*BjGSTF12*基因序列中包含2个内含子，内含子序列分别在148～232 bp、282～353 bp。芥菜*BjGSTF12*基因全长CDS序列为651 bp，编码216个氨基酸。通过BLAST在线比对，芥菜GSTF12基因片段与甘蓝型油菜*BnGSTF12*（*Brassica napus*，XM_013794351）、白菜（*B. rapa*，XM_009127922.3）、拟南芥AtGSTF12（*Arabidopsis thaliana*，NM_121728.4）核苷酸序列的同源性分别为94%、94%和88%。因此，将该芥菜基因命名为*BjGSTF12*。

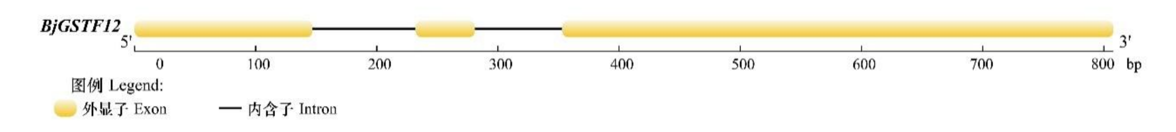


图2 芥菜*BjGSTF12*基因结构图

Fig. 2 Genetic structure diagram of *BjGSTF12* from *Brassica juncea*

2.2 芥菜 BjGSTF12 蛋白序列的生物信息学分析

利用 ProtParam 对芥菜 BjGSTF12 编码氨基酸序列进行分析，结果显示：芥菜 BjGSTF12 编码 216 个氨基酸，分子量为 24.80 kDa，原子组成为 $C_{1121}H_{1765}N_{297}O_{313}S_{12}$，主要由亮氨酸（Leu，11.6%）、缬氨酸（Val，9.7%）、丙氨酸（Ala，8.8%）、谷氨酸（Glu，8.8%）等氨基酸组成。该氨基酸序列的理论等电点（pI）为 5.73，平均疏水率为–0.075，脂肪酸系数为 98.38，不稳定系数为 38.30。这表明芥菜 BjGSTF12 为稳定性蛋白。

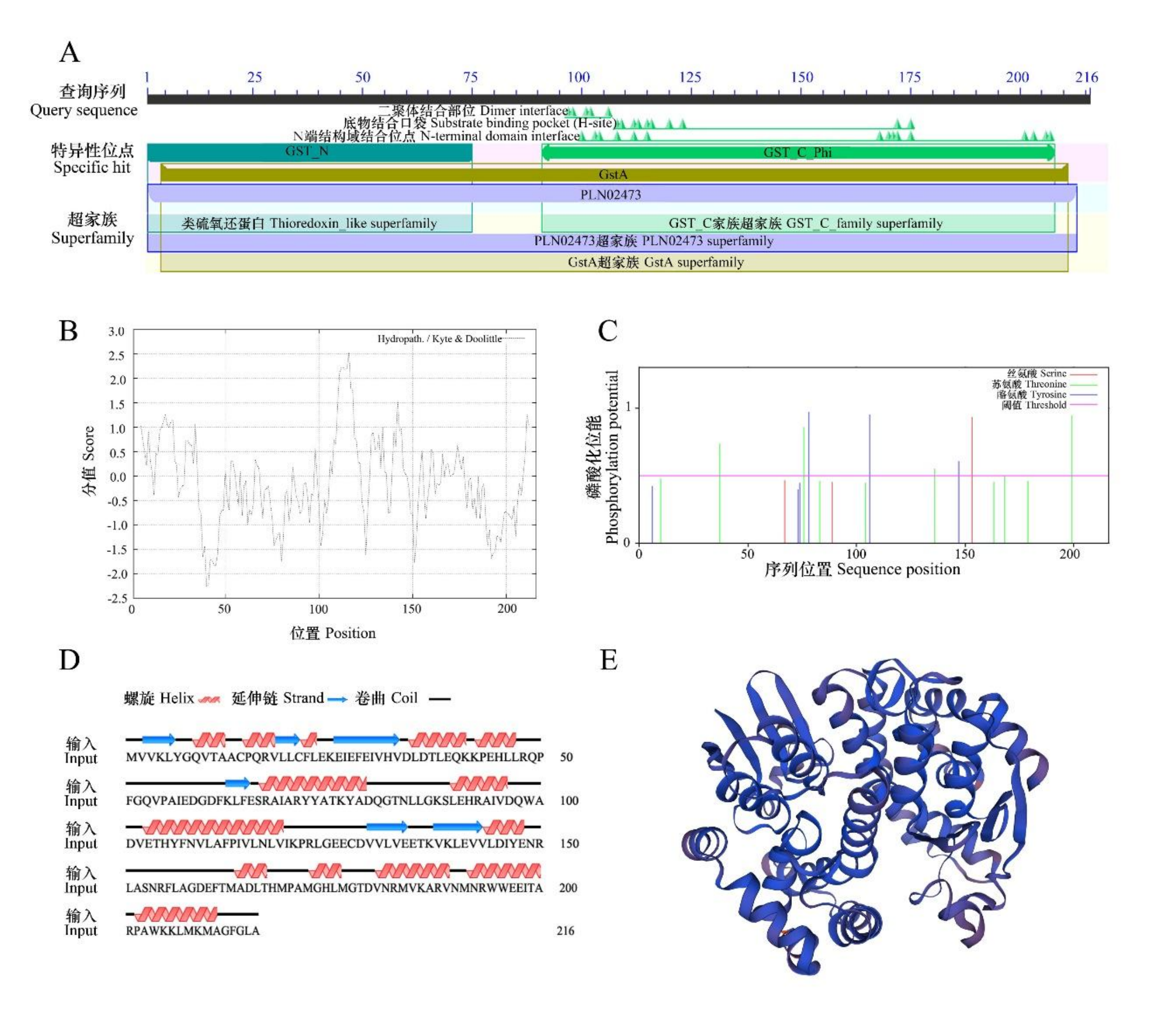
利用 NCBI 网站保守结构域分析网站（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）对芥菜BjGSTF12 基因编码氨基酸进行保守结构域分析，结果如图 3：A所示。预测结果表明：芥菜BjGSTF12 具有GST_NTERHE 和GST_CTER两个结构域，保守结构域的位置为：1～75、91～207 位氨基酸，^{1}MVVKLYGQVTAACPQRVLLCFLEKEIEFEIVHVDL DTLEQKKPEHLLRQPFGQVPAIEDGDFKLFESRAIARYYA^{75}； ^{91}EHRAIVDQWADVETHY FNVLAFPIVLNLVIKPRLGEECDVVLVEETKVKLEVVLDIYENRLASNRFLAGDEFTMAD LTHMPAMGHLMGTDVNRMVKARVNMNRWWEEITARPAWKKL^{207}。由此可见，芥菜 BjGSTF12 具有GST-C保守结构域，属于GST基因家族成员（图 3：A）。

利用 ExPASY ProtScale 预测芥菜 BjGSTF12 氨基酸序列的亲疏水性，预测结果表明：芥菜 BjGSTF12 的最大正分值（2.522）位于肽链中的第 116 位氨基酸，最小负分值（–2.256）位于第 40 位氨基酸，整条肽链的亲水性氨基酸数量多于疏水性氨基酸数量。由此推测，芥菜 BjGSTF12 可能为亲水性蛋白（图 3：B）。

运用 Expasy 的 SOPMA 对芥菜 BjGSTF12 的二级结构进行分析预测，结果显示：BjGSTF12 蛋白含有α-螺旋（alpha helix）46.30%、β-折叠延伸链（extended strand）15.28%、β-转角（beta turn）7.41%、无规则卷曲（random coil）31.02%。由此可见，芥菜 BjGSTF12 蛋白的主要组成部分为α-螺旋，而延伸链、β-折叠、无规则卷曲则散布于蛋白结构中（图 3：D）。

用 NetPhos 3.1 对芥菜 BjGSTF12 进行潜在磷酸化位点分析，结果表明芥菜 BjGSTF12 存在几个潜在的磷酸化位点。芥菜 BjGSTF12 磷酸位点最多的是苏氨酸磷酸位点（threonine，Thr），为 4 个，酪氨酸磷酸化位点（tyrosine，Tyr）次之，为 3 个，丝氨酸磷酸位点（serine，Ser）最少，为 1 个。这说明芥菜 BjGSTF12 可能被苏氨酸、酪氨酸、丝氨酸激酶磷酸化，从而实现其调控功能（图 3：C）。通过 SignalP 6.0 预测分析芥菜 BjGSTF12 氨基酸序列，发现无信号肽序列，说明芥菜 BjGSTF12 为非分泌型蛋白。

利用Plant-PLoc server（www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/PlantPloc.cgi）预测芥菜BjGSTF12 亚细胞定位，结果表明芥菜BjGSTF12 定位于细胞质中。利用TMHMM Server 2.0 分析该蛋白无跨膜结构。使用SWISS-MODEL在线软件预测芥菜BjGSTF12 的三级结构，结果表明：芥菜BjGSTF12 蛋白的主要结构为α-螺旋，延伸链、β-折叠、无规则卷曲则散分布于蛋白结构中，与二级结构预测结果一致；芥菜BjGSTF12 蛋白三级结构为单体结构，结果如图 3：E 所示。



A. 保守结构域分析；**B.** 亲疏水性预测；**C.** 磷酸化位点预测；**D.** 二级结构预测；**E.** 三级结构预测

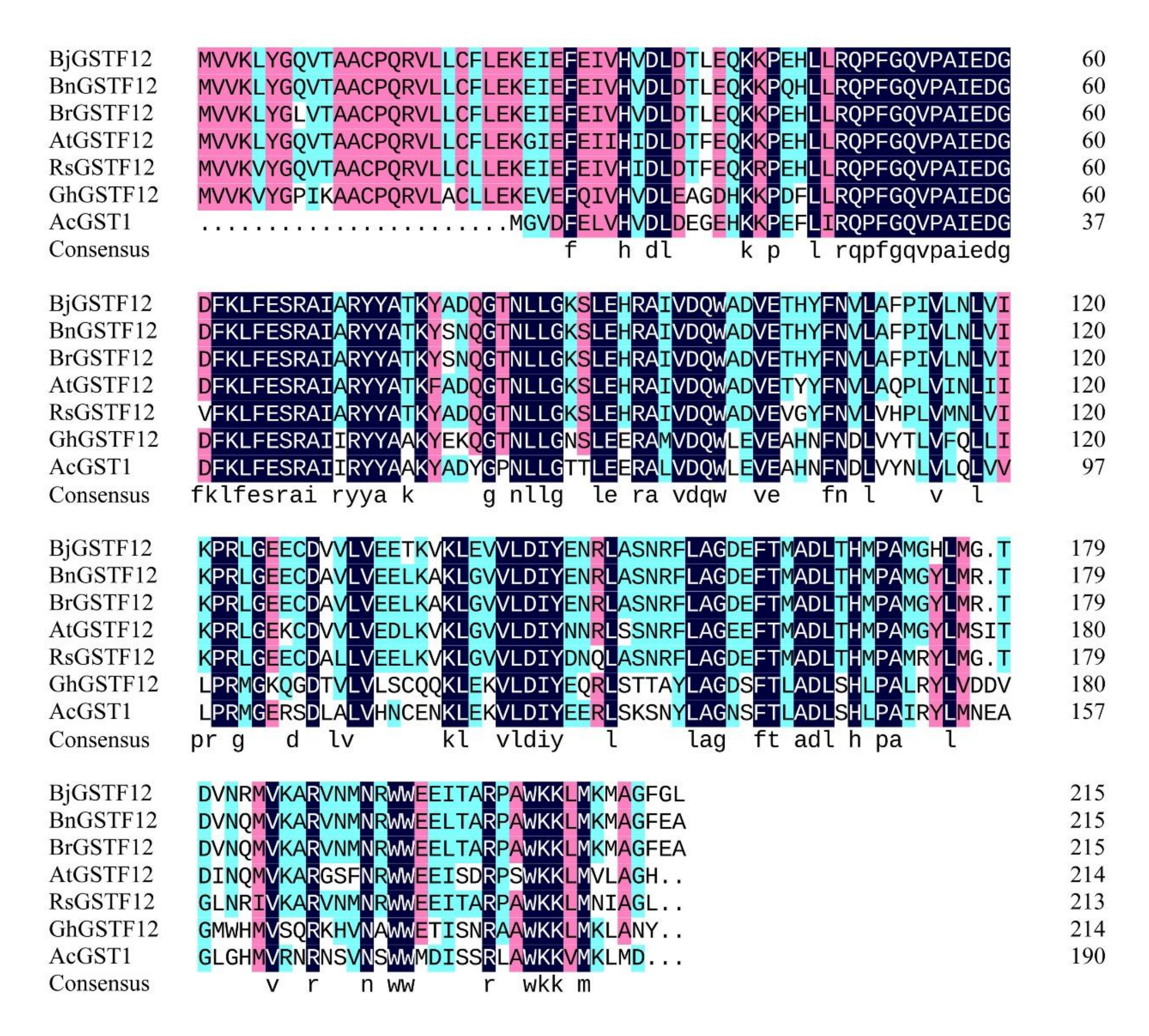
A. Conserved domain prediction; **B.** Hydrophilicity and hydrophobicity prediction; **C.** Potential phosphorylation sites analysis; **D.** Secondary structure analysis; **E.** Tertiary structure prediction

图 3 芥菜 BjGSTF12 蛋白的生物信息学分析

Fig. 3 Bioinformatic analysis of the BjGSTF12 protein from *Brassica juncea*

2.3 芥菜 BjGSTF12 编码氨基酸的同源性比对及系统进化分析

将芥菜 BjGSTF12 与油菜 BnGSTF12（XP_048602386.1）、拟南芥 AtGSTF12/AtTT19（NP_197224.1）、白菜 BrGSTF12（XP_009126170.1）、萝卜 RsGSTF12（XP_018444305.1）、棉花 GhGSTF12（XP_016744877.2）以及猕猴桃 AcGST1（PSS21435.1）等序列进行氨基酸序列多重比对分析，结果如图 4 所示。芥菜 BjGSTF12 与其他物种 GST 氨基酸的同源性相似性介于 52.07%～95.31%，其中，芥菜 BjGSTF12 与猕猴桃 AcGST1 的相似性最低，为 52.07%，与油菜 BnGSTF12 相似性最高，达 95.31%。



Bn. 甘蓝型油菜；**Br.** 白菜；**At.** 拟南芥；**Rs.** 萝卜；**Gh.** 棉花；**Ac.** 猕猴桃。下同。

Bn. *Brassica napus*; **Br.** *Brassica rapa*; **At.** *Arabidopsis thaliana*; **Rs.** *Raphanus sativus*; **Gh.** *Gossypium hirsutum*; **Ac.** *Actinidia chinensis*. The same below.

图 4 芥菜 BjGSTF12 与其他物种 GSTs 蛋白序列多重比对

Fig. 4 Multiple alignment of BjGSTF12 protein from *Brassica juncea* and GST proteins from other species

利用 MEME 在线分析工具对芥菜 BjGSTF12 与其他物种 GSTs 蛋白保守结构域进行分析，结果如图 5 所示，共获得 10 个保守基序，分别为 Motif 1 ~ Motif 10。结果显示，在芥菜 BjGSTF12 与油菜、白菜、拟南芥、萝卜等物种 GSTs 成员中，共有 6 个保守基序，分别为 Motif 1 ~ Motif 6；猕猴桃 AcGST1 与油菜 BnGSTF12 还包含 Motif 8 和 Motif 10 保守基序，而猕猴桃 AcGST1 与棉花 GhGSTF12 还包含 Motif 7 保守基序，但在其他物种的 GSTs 成员不含这几个基序。在 7 个物种的 GSTs 成员中，均含有 Motif 1、Motif 2、Motif 4、Motif 5 等 4 个保守基序。

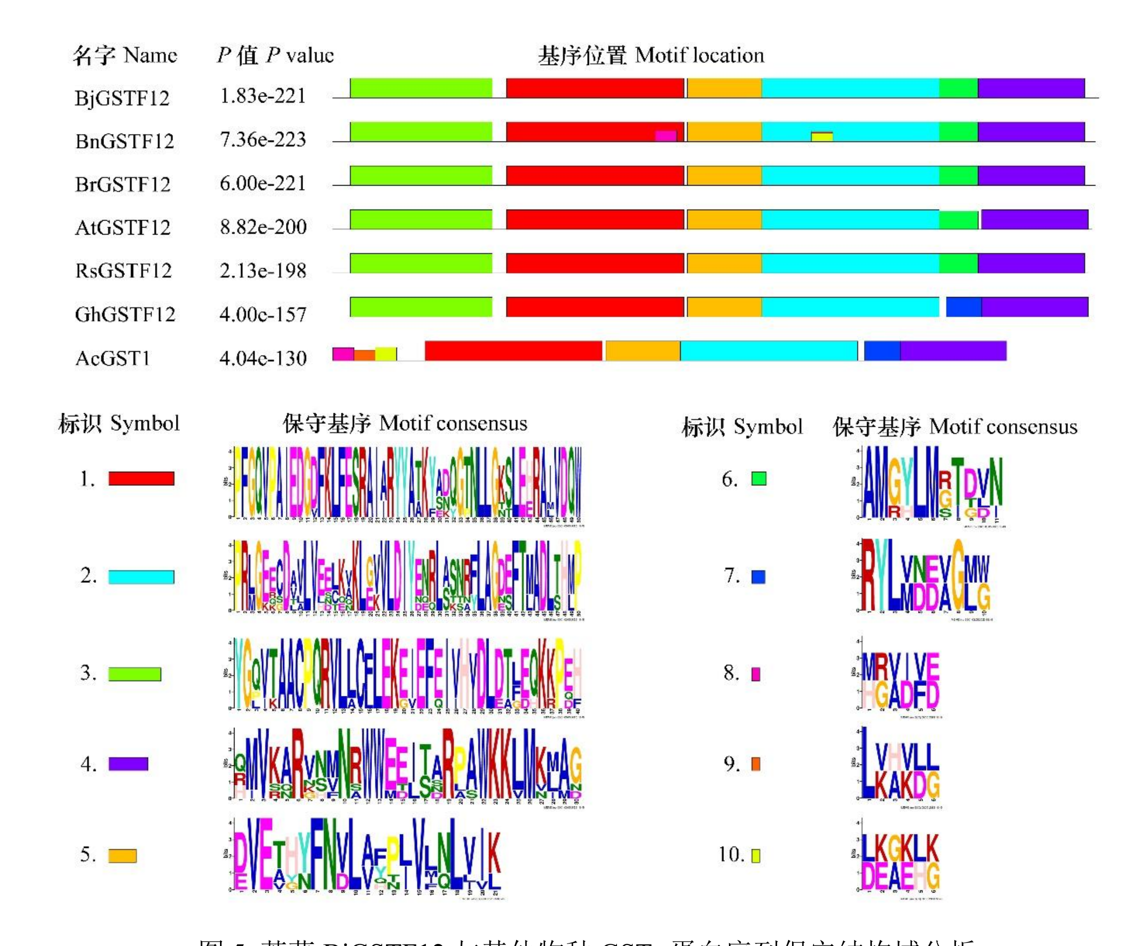


图 5 芥菜 BjGSTF12 与其他物种 GSTs 蛋白序列保守结构域分析

Fig. 5 Analysis of protein conserved domains of BjGSTF12 protein from *Brassica juncea* and GST proteins from other species

为了进一步了解芥菜 BjGSTF12 与其他 GST 家族成员的进化关系，将其与 50 个拟南芥 GST 基因家族成员进行进化树分析。结果表明，拟南芥 GST 基因家族成员聚类为 7 个亚家族，分别为τ亚类（28 个成员）、φ亚类（11 个成员）、DHAR 亚类（3 个成员）、ζ亚类（2 个成员）、θ亚类（2 个成员）、λ亚类（2 个成员）、TCHQD 亚类（1 个成员）。芥菜 BjGSTF12 与拟南芥 GSTF12 先聚类在一起，后与 ATGSTF11 聚类在一簇，属于φ亚类成员，而与其他亚类成员相距较远（图 5）。本结果再次表明该文所克隆的芥菜 *BjGSTF12* 基因属于植物 GST 基因家族成员。

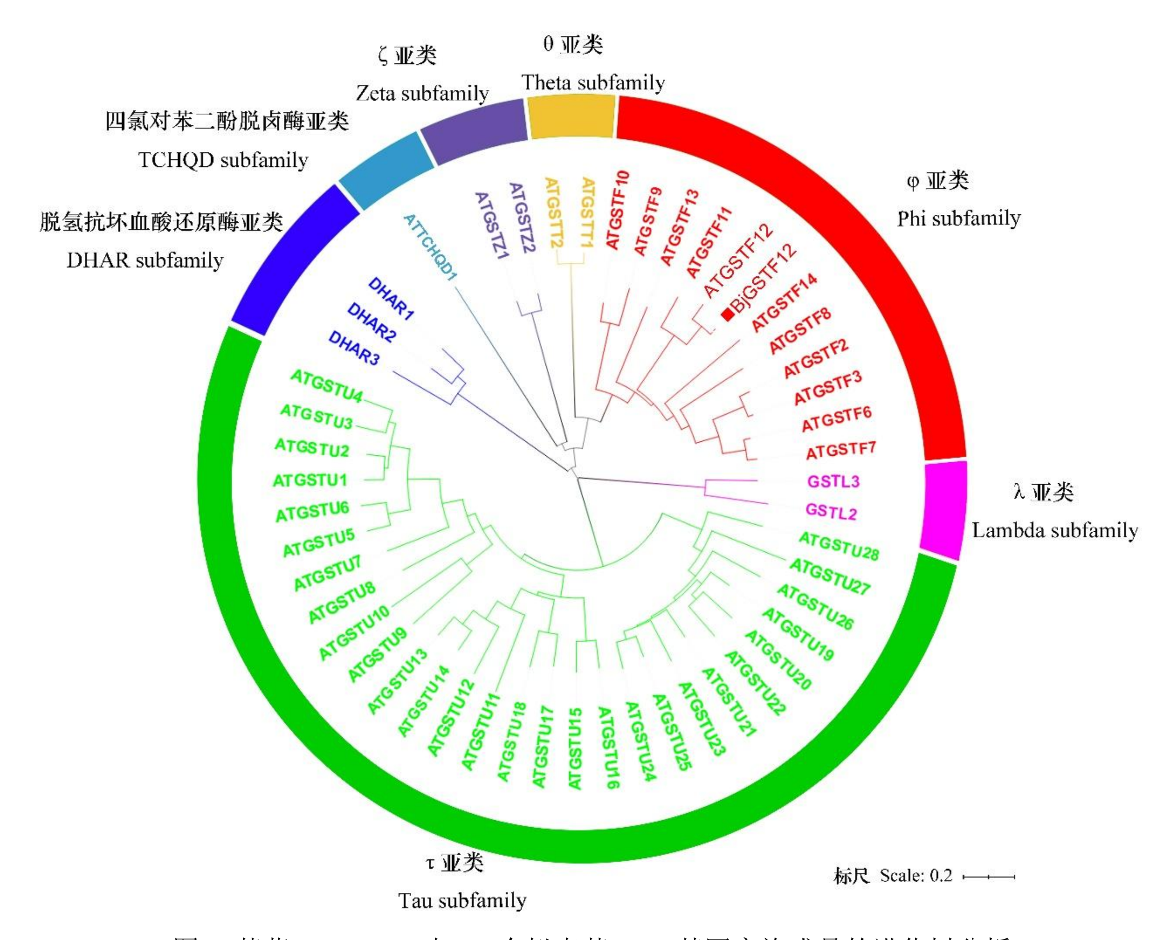
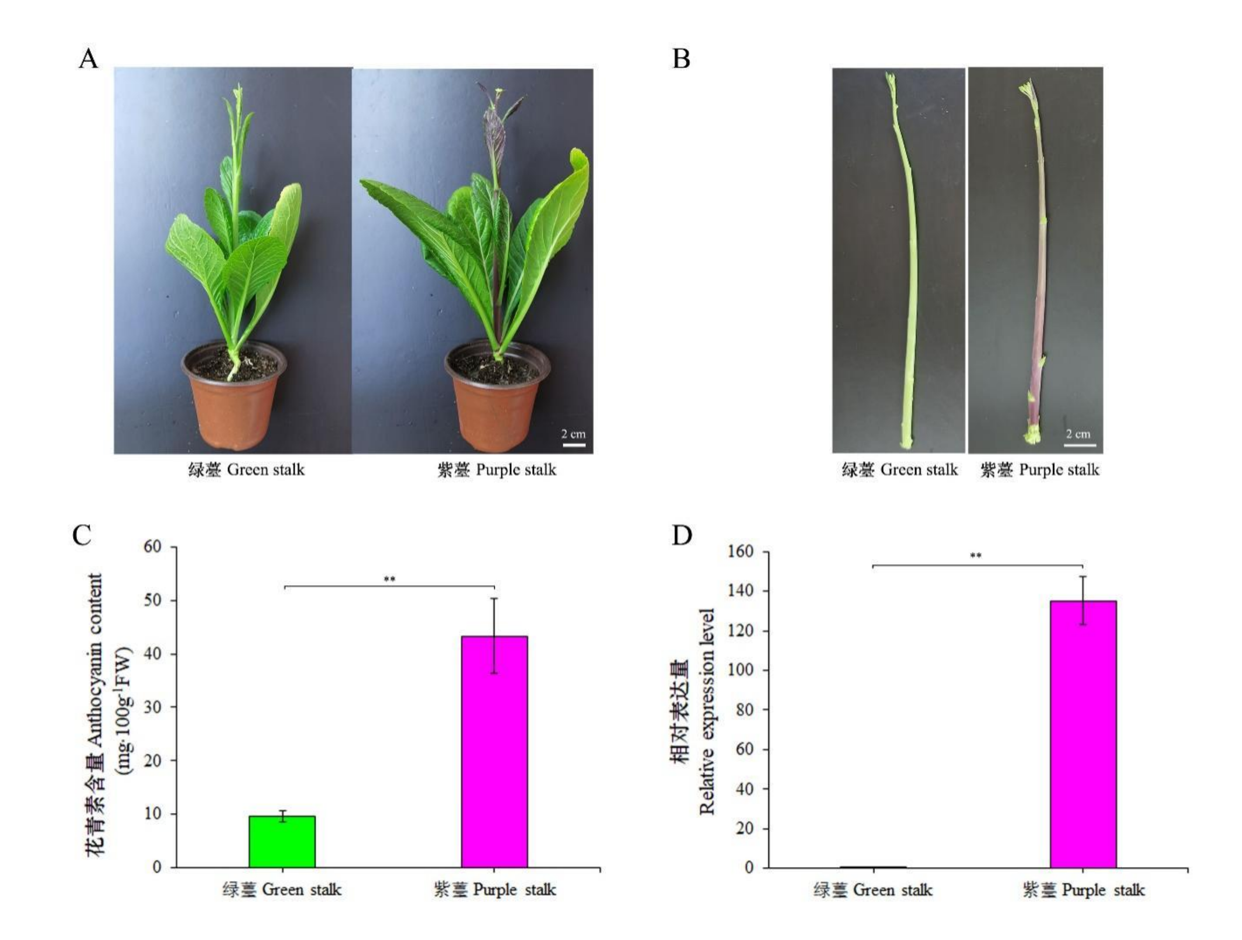


图 6 芥菜 BjGSTF12 与 50 个拟南芥 GST 基因家族成员的进化树分析

Fig. 6 Evolutionary tree analysis of BjGSTF12 from *Brassica juncea* and 50 GST proteins from *Arabidopsis thaliana*

2.5 绿薹、紫薹芥菜近等基因系花青素含量及 *BjGSTF12* 基因表达量分析

为进一步了解芥菜 *BjGSTF12* 基因在薹茎表皮花青素合成中的作用，利用前期选育不同茎色芥菜近等基因系：绿薹芥菜、紫薹芥菜，分析其薹茎表皮花青素含量与 *BjGSTF12* 基因的表达情况。由图 7：A、B 可看出，绿薹芥菜无论叶片还是薹茎、薹叶均为绿色，而紫薹芥菜叶片颜色为绿色，薹茎及幼嫩薹叶表现出明显紫色。通过对两种芥菜薹茎花青素含量分析表明，紫薹芥菜的花青素含量极显著高于绿薹芥菜的（$P<0.01$）（图 7：C）；*BjGSTF12* 基因在绿薹芥菜中仅有微弱表达，而其在紫薹芥菜中的表达水平明显高于绿薹芥菜的，二者之间差异达到极显著水平（图 7：D）。通过比较 *BjGSTF12* 基因在绿薹芥菜和紫薹芥菜中的表达水平及其薹茎表皮花青素含量差别，结果表明，*BjGSTF12* 在不同薹色芥菜的基因表达水平与花青素含量呈现类似的变化规律。



A. 近等基因系芥菜表型；**B.** 绿薹芥菜和紫薹芥菜薹茎局部图；**C.** 花青素含量；**D.** 相对表达量分析。

A. The phenotype of near-isogenic lines of green stalk and purple stalk mustard; **B.** Partial graph of green stalk and purple stalk mustard; **C.** Anthocyanin content; **D.** Relative expression level.

图 7 不同薹色近等基因系芥菜花青素含量与 *BjGSTF12* 基因表达量情况

Fig. 7 Anthocyanin content and expression analysis of *BjGSTF12* in different stalk color near-isogenic lines of *Brasscia juncea*

2.6 芥菜 *BjGSTF12* 基因的启动子顺式作用元件预测

从芥菜基因组数据中调取 *BjGSTF12* 翻译起始位点上游启动子序列，设计引物，分别用绿薹芥菜和紫薹芥菜基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增、测序，分别获得 1 855、1 857 bp 序列，利用 DNAMAN 软件进行比对（图 8）。两个芥菜品系的 *BjGSTF12* 启动子序列相似度为 99.78%，与绿薹芥菜相比，紫薹芥菜 *BjGSTF12* 启动子在第 130、1 333 bp 处分别插入了 1 个 G、A 碱基，在第 937、980 bp 处的 T 碱基分别突变为 A 和 G 碱基（图 8）。为进一步了解 2 个芥菜品系 *BjGSTF12* 启动子的差别，利用 PlantCare 在线网站预测其作用元件，并用 TBtools 软件进行可视化，结果如图 9 所示。2 个品系 *BjGSTF12* 启动子序列预测的顺式作用元件相同，均含有 9 个真核生物转录起始核心的启动子作用元件（TATA-box）和 5 个启动子和增强子区域的共同顺式作用元件（CAAT-box），含有 9 个 MYB 转录因子结合位点（6 个 MYB 作用元件、3 个 MYB-like sequences 作用元件）、1 个赤霉素响应元件（GARE 作用元件）、1 个厌氧诱导响应元件（ARE 作用元件）、2 个损伤和防御响应元件（WRE3），另外，该启动子序列还有 8 个未知作用元件（1 个作用元件为 taTAAATATct、7 个作用元件为 CTCC）（图 9）。

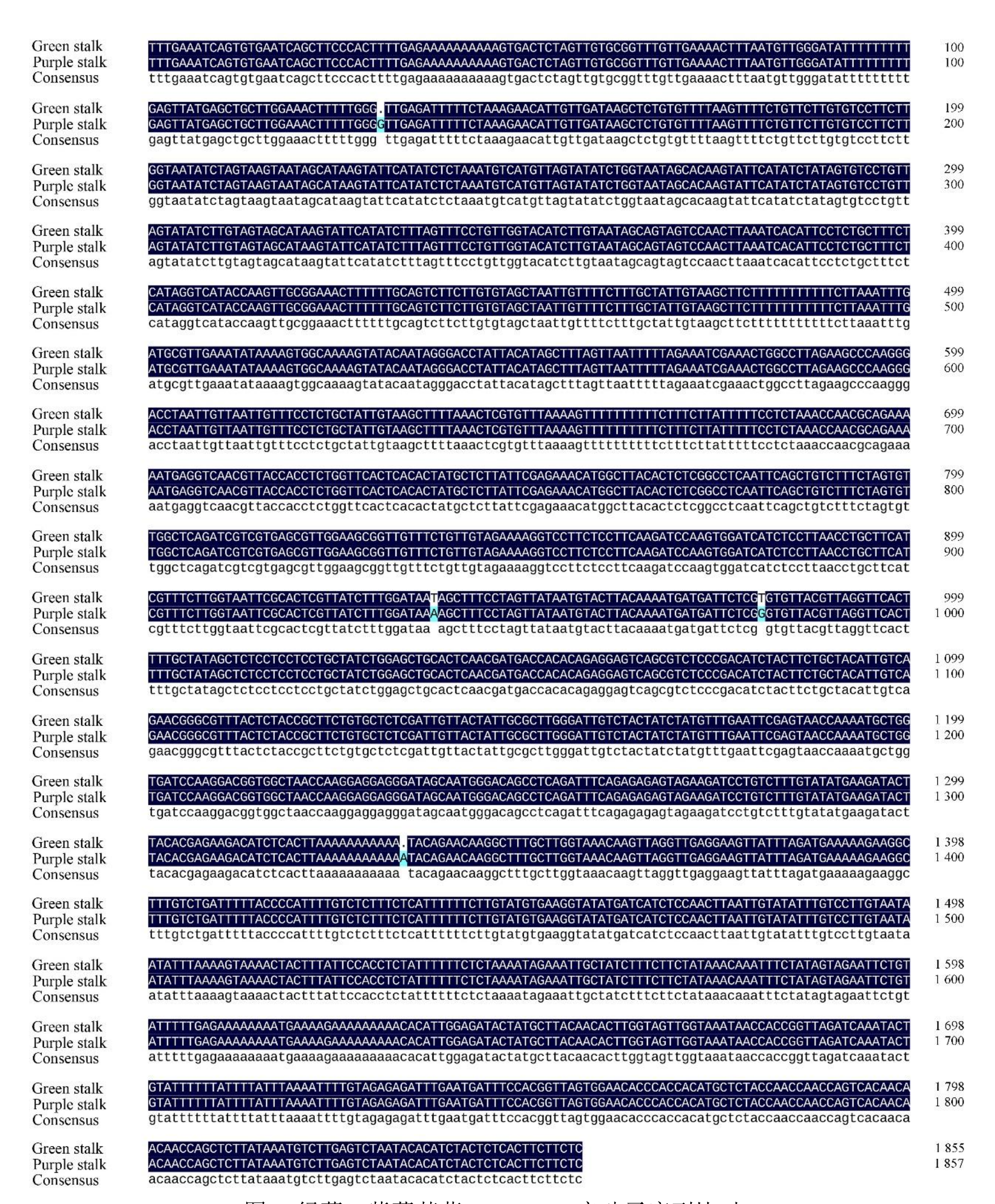
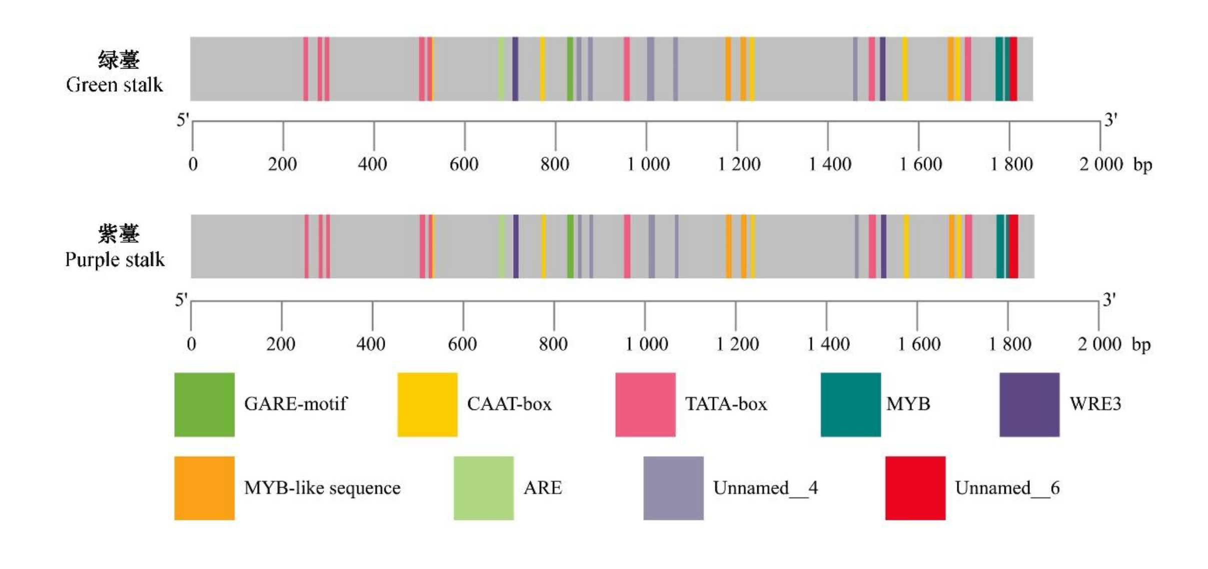


图 8 绿薹、紫薹芥菜 *BjGSTF12* 启动子序列比对

Fig. 8 Alignment of *BjGSTF12* promoter sequences from *Brassica juncea* with green stalk and purple stalk



、、

图 9 绿薹、紫薹芥菜 *BjGSTF12* 基因启动子顺式作用元件分布图

Fig. 9 *Cis- elements* in the putative promoter region of *BjGSTF12* genes from *Brassica juncea* with green stalk and purple stalk

2.7 芥菜 BjGSTF12 蛋白互作关系

用 STRING 交互式数据库构建芥菜 BjGSTF12 蛋白与其他蛋白的互作关系网络图，进而预测与 BjGSTF12 可发生互作的蛋白。选择模式植物拟南芥，构建芥菜 BjGSTF12 蛋白的互作关系网络图（图 10）。结果表明，芥菜 BjGSTF12 蛋白与二氢黄酮醇还原酶（dihydroflavonol-4-reductase，DFR）、查尔酮合成酶（transparent testa 4/chalcone synthase，TT4/CHS）、无色花青素双加氧酶（leucoanthocyanidin dioxygenase，LDOX）、类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶（anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase，UF3GT）、丙二酰辅酶 A：花青素 5-O-葡萄糖苷-6"-O-丙二酰转移酶（malonyl-CoA:anthocyanidin 5-O-glucoside-6-O-malonyltransferase，AT5MAT）、MATE 转运蛋白（transparent testa 12，TT12）、H^+泵类型跨膜转运蛋白（autoinhibited H^+-ATPase isoform 10，AHA10）、UDP-糖基转移酶超家族成员（AT4G14090）、HXXXD-型酰基转移酶家族蛋白（AT1G03495）等蛋白存在互作，其中 DFR、TT4、LDOX、UF3GT 为花青素生物合成中关键酶，AT5MAT、AT4G14090、AT1G03495 主要负责花青素糖基化、酰基化修饰，TT12 和 AHA10 主要负责原花青素单体向液泡的转运。可见，芥菜 BjGSTF12 可能通过与这些互作蛋白相互作用参与花青素生物合成、修饰及转运。

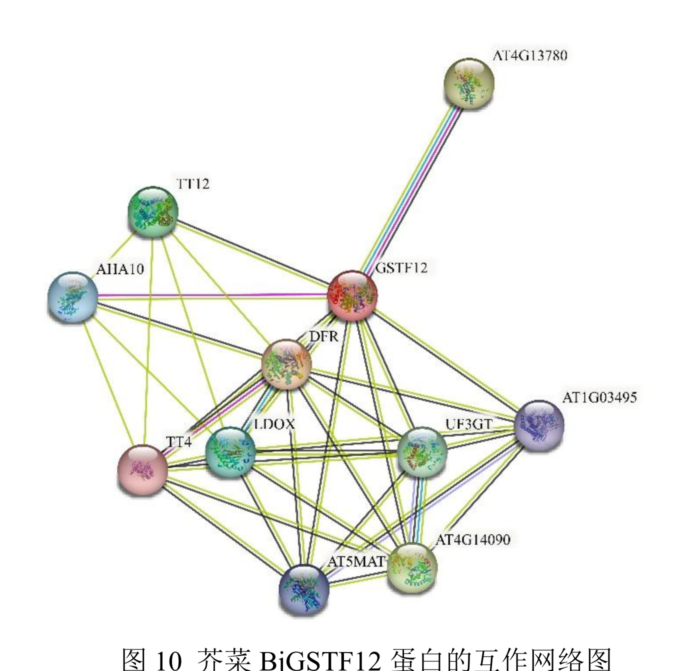


图 10 芥菜 BjGSTF12 蛋白的互作网络图

Fig. 10 Interaction network map of BjGSTF12 from *Brassica juncea*

3 讨论与结论

谷胱甘肽转移酶是一种多功能酶，在细胞解毒（陈秀华等，2013）、抵抗逆境胁迫（Lallement et al., 2014）、花青素等次生代谢转运（Marrs et al., 1995；Sun et al., 2012）等方面中发挥重要作用。但目前有关芥菜*GST*基因的功能及其与蔬菜薹茎颜色形成之间关系的研究报道还较少。本研究从紫薹芥菜中分离*BjGSTF12*基因的基因组序列和开放阅读框序列，该基因序列含有3个外显子和2个内含子（图2）。利用NCBI网站分析该基因编码氨基酸序列具有GST_NTERHE和GST_CTER两个结构域，这表明芥菜BjGSTF12具有GST蛋白的GST-N和GST-C保守结构域，属于GST基因家族成员（图3：A）。通过进一步的系统进化树分析，该文所获得的芥菜BjGSTF12与拟南芥φ亚类GST成员聚类为一个类群，与拟南芥AtGSTF12的亲缘关系最近，表明该基因属于GST基因家族φ亚类成员（图5）。花青素是类黄酮化合物，为植物提供从红色、粉红色、橙色到蓝色的一系列颜色，是评价植物花色、叶色、果色等器官色泽及营养品质的重要指标。花青素在细胞质中合成，由苯丙氨酸解氨酶（phenylalanin ammonialyase，PAL）、TT4/CHS、黄烷酮3-羟化酶（flavanone 3-hydroxylase，F3H）、DFR、UF3GT、LDOX等酶参与完成（侯泽豪等，2017）；主要通过空泡隔离积聚在液泡中，其中包括GST、多药和有毒化合物挤出（multidrug and toxin extrusion，MATE）以及ATP结合盒（ATP binding cassette，ABC）转运体（Shao et al., 2021）。本研究在紫薹芥菜和绿薹芥菜克隆得到的*BjGSTF12*基因，其核苷酸序列和氨基酸序列比对结果一致，且芥菜基因组*BjuVB05G21730*基因序列也完全一致，CDS序列长度为651 bp，编码216个氨基酸残基，该序列与油菜、白菜、拟南芥、萝卜GSTF12氨基酸序列同源性较高，达84.33%～95.31%。GST蛋白除参与逆境胁迫调控外，也参与花青素的转运（Marrs et al., 1995；Kitamura et al., 2004）。在拟南芥（Sun et al., 2012）、棉花（Shao et al., 2021）、萝卜（Niu et al., 2022）等植物中陆续被报道，GSTF12参与花青素从细胞质转运到液泡的过程。此外，在猕猴桃、马铃薯等物种中，GST1也可作为花青素运输载体转运花青素至液泡（Liu et al., 2019；Zhang et al., 2023）。这些结果也证明了植物*GSTF*基因在花青素积累中的功能是保守的。本研究发现，*BjGSTF12*基因在绿薹芥菜中仅有微弱表达，而在紫薹芥菜中的表达水平明显提高（图7D）。且在不同薹色芥菜*BjGSTF12*基因表达水平与花青素含量有类似的变化规律。

本研究中，尽管紫薹、绿薹芥菜在花青素含量和*BjGSTF12*基因表达水平方面存在明显差异，但是从2个芥菜品系中克隆的*BjGSTF12*基因序列完全一致，这暗示*BjGSTF12*基因对芥菜花青素合成积累的影响可能发生在转录水平。为此，我们从绿薹芥菜、紫薹芥菜中分离*BjGSTF12*启动子序列，发现两个品系*BjGSTF12*启动子序列相似度为99.78%，紫薹芥菜*BjGSTF12*启动子有4处存在单碱基的突变或插入（图8）。利用Plantcare网站对启动子序列预测结果表明，这2个*BjGSTF12*启动子序列的顺式作用元件种类与数目均相同（图9），主要含有MYB转录因子结合位点、赤霉素响应元件、厌氧诱导响应元件以及损伤和防御响应元件等作用元件（图9）。前人研究表明GST受MYB转录因子的调控，从而促进花青素积累（Hu et al., 2016；Zhang et al., 2023）；在油菜中，GSTF12与MYB5、MYB56、MYB61、MYB118等多个MYB转录因子存在共表达（Wei et al., 2019）。Goswami等（2018）利用杂交创制富含花青素的甘蓝型油菜，研究表明TT19（GSTF12）与MYB111、TT8共同调控花青素合成和积累。此外，除MYB结合位点外，*BjGSTF12*启动子还受激素、环境因子等调控。然而，紫薹芥菜*BjGSTF12*启动子序列的突变和插入与该基因在绿薹、紫薹芥菜表达差异之间的关系，也有待进一步研究。

利用STRING数据库分析芥菜BjGSTF12互作蛋白网络，芥菜BjGSTF12与DFR、TT4/CHS、LDOX、UF3GT等花青素合成关键酶存在互作与TT12和AHA10等负责原花青素单体向液泡转运的蛋白存在互作；此外，BjGSTF12与AT5MAT、AT4G14090、AT1G03495等负责花青素糖基化、酰基化修饰蛋白也存在互作关系。然而，研究者指出GST本身并不能直接催化花青素生物合成，它作为载体将花青素从细胞质转运至液泡（Sun et al., 2012）。可见，芥菜BjGSTF12可能通过互作蛋白相互作用调控花青素的生物合成、修饰、转运，从而影响花青素的积累。然而，目前本研究还缺少足够的试验证据支持，今后将通过亚细胞定位、基因功能鉴定、构建酵母文库并筛选芥菜*GST*基因上游转录因子等方面着手，深入探究GST在芥菜薹茎花青素积累过程中生物学功能及其作用机制。

综上所述，我们从绿薹、紫薹芥菜中克隆并分析了*BjGSTF12*基因、启动子序列，结果分析表明该基因属于植物GST基因家族的Phi亚家族成员，其启动子包含的顺式作用元件种类和数目，仅存在几处碱基突变/插入，然而该基因在绿薹、紫薹芥菜中表达量存在显著差异，且与芥菜薹茎花青素含量有类似的变化规律，这表明BjGSTF12为功能基因，可能在芥菜薹茎花青素积累中发挥重要作用，为今后芥菜花青素积累机制研究提供了1个候选基因。然而，要想全面了解BjGSTF12调控芥菜花青素积累的具体作用机制还有待于进一步研究。

参考文献:

CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, et al., 2020. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Mol Plant, (13): 1194-1202.

CHEN XH, WANG ZY, LI XP, et al., 2013. Research progress on glutathione S-transferases [J]. J Northeast Agric Univ, 44(1): 149-153. [陈秀华，王臻昱，李先平，等，2013. 谷胱甘肽S-转移酶的研究进展[J]. 东北农业大学学报，44(1): 149-153.]

CUMMINS I, DIXON DP, FREITAG-POHL S, et al., 2011. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification [J]. Drug Metab Rev, 43 (2): 266-280.

FU M, CHEN G, TANG K, et al., 2022. Research progress and prospect of mustard breeding [J]. Guangdong Agric Sci, 49(10): 9-18. [符梅，陈刚，唐康，等，2022. 芥菜育种研究进展与展望[J]. 广东农业科学，49(10): 9-18.]

GOSWAMI G, NATH UK, PARK J, et al., 2018. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in a high anthocyanin resynthesized *Brassica napus* cultivar [J]. J Biol Res-Thessalon, (25): 19.

HOU ZH, WANG SP, WEI SD, et al., 2017. Anthocyanin biosynthesis and regulation in plants [J]. Guihaia, 37(12): 1603-1613. [侯泽豪，王书平，魏淑东，等，2017. 植物花青素生物合成与调控的研究进展[J]. 广西植物，37(12): 1603-1613.]

HU B, ZHAO J, LAI B, et al., 2016. *LcGST4* is an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in *Litchi chinensis* Sonn [J]. Plant Cell Rep, (35): 831-843.

KITAMURA S, SHIKAZONO N, TANAKA A, 2004. Transparent testa 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 37(1): 104-114.

LALLEMENT PA, BROUWER B, KEECH O, et al., 2014. The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants [J]. Front Pharmacol, (5): 192.

LI H, ZHU L, YUANG G, et al., 2016. Fine mapping and candidate gene analysis of an anthocyanin-rich gene, *BnaA.PL1*, conferring purple leaves in *Brassica napus* L. [J]. Mol Genet Genom, (291): 1523-1534.

LIU LB, SONG YX, ZHANG HJ, et al., 2021. Genome-wide identification and expression analysis of *GST* gene family in pomegranate (*Punica granatum*) [J]. Mol Plant Breed, 19(16): 5307-5317. [刘龙博，宋运贤，张慧君，等，2021. 石榴*GST*基因家族全基因组鉴定及表达分析[J]. 分子植物育种，19(16): 5307-5317.]

LIU PY, 1996. Chinese mustard [M]. Beijing: China Agricultural Press: 24-56. [刘佩瑛，1996. 中国芥菜. 北京：中国农业出版社：24-56.]

LIU Y, QI Y, ZHANG A, et al., 2019. Molecular cloning and functional characterization of AcGST1, an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) [J]. Plant Mol Biol, (100): 451-465.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 25(4): 402-408.

MARRS KA, ALFENLTO MR, LLOYD AM, et al., 1995. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2* [J]. Nature, (375): 397-400.

MOHSENZADEH S, ESMAEILI M, MOOSAVI F, et al., 2011. Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. Afr J Biotechnol, (10): 8160-8165.

NIU M, BAO C, CHEN J, et al., 2022. RsGSTF12 contributes to anthocyanin sequestration in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Front Plant Sci, (13): 870202.

SHAO D, LI Y, ZHU Q, et al., 2021. GhGSTF12, a glutathione S-transferase gene, is essential for anthocyanin accumulation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Plant Sci, (305): 110827.

SUN Y, HONG L, HUANG JR, et al., 2012. *Arabidopsis* TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts [J]. Mol Plant, (5): 387-400.

WAN ZJ, FAN YH, MENG QF, et al., 2020. Development and prospect of mustard seed industry in China [J]. Chin Veget, 382(12): 1-6. [万正杰，范永红，孟秋峰，等，2020. 中国芥菜种业发展与展望[J]. 中国蔬菜，382(12): 1-6.]

WEI L, ZHU Y, LIU R, et al., 2019. Genome wide identification and comparative analysis of glutathione transferases (GST) family genes in *Brassica napus* [J]. Sci Rep, (1): 1-13.

XING L, GUO YY, WANG ZQ, et al., 2020. Cloning and bioinformatics analysis of *GST* gene of *Leymus chinensis* [J]. J Shanxi Agric Univ (Nat Sci Ed), 40(5): 48-56. [邢磊，郭园艺，汪自庆，等，2020. 羊草*GST*基因的克隆及序列分析[J]. 山西农业大学学报（自然科学版），40(5): 48-56.]

ZHANG CJ, CHENG B, YANG L, et al., 2022. Mung bean glutathione transferase-coding genes and its response to cadmium stress based on genome-wide identification and transcriptome analysis [J].Acta Agric Boreal-Occident Sin, 31(6): 703-717. [张创娟，程斌，杨乐，等，2022. 基于全基因组和转录组的绿豆谷胱甘肽转移酶基因及其对镉胁迫的响应[J]. 西北农业学报，31(6): 703-717.]

ZHANG X, TAO L, QIAO S, et al., 2017. Role of glutathione transferase in plant resistance to abiotic stresses [J]. Chin Biotechnol, 37 (3): 92-98.[张雪，陶磊，乔晟，等，2017. 谷胱甘肽转移酶在植物抵抗非生物胁迫方面的角色[J]. 中国生物工程杂志，37(3): 92-98.]

ZHANG ZH, ZHANG HL, LIU TF, et al., 2023. Functional analysis of the anthocyanin-associated glutathione S-transferase gene *StGST1* in potato [J]. Potato Res, (66): 215-230.